

## ⑫ 特許公報(B2)

昭62-49038

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公告 昭和62年(1987)10月16日  
 C 12 P 13/18 7236-4B  
 C 12 P 13/14 A-7236-4B  
 //(C 12 P 13/14  
 C 12 R 1:15)  
 (C 12 P 13/14  
 C 12 R 1:13)

発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 L-グルタミンの製造法

⑯ 特 願 昭54-118834

⑰ 公 開 昭56-42593

⑱ 出 願 昭54(1979)9月18日

⑲ 昭56(1981)4月20日

⑳ 発 明 者 勝 亦 瞭 一 町田市成瀬2-12-3 ポプラケ丘コープ6-401

㉑ 発 明 者 高 山 健 一 郎 厚木市鷺尾1丁目9番10号

㉒ 出 願 人 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

審 査 官 佐 伯 裕 子

微生物の受託番号 FERM P-4412 FERM P-4414

1

2

## ㉓ 特許請求の範囲

1 コリネバクテリウム属又はプレビバクテリウム属に属し、リゾチームに感受性を有し、かつ培地中に存在する過剰のビオチンによつてL-グルタミンの生産が抑制されない微生物を培地に培養し、L-グルタミンを培養物中に生成させ、該培養物からL-グルタミンを採取することを特徴とするL-グルタミンの製造法。

## 発明の詳細な説明

本発明はコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属に属する微生物を培地に培養してL-グルタミンを培地中に蓄積させ、これを採取する方法において、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する過剰のビオチンによつてL-グルタミンの生産が抑制されない菌株を用いることを特徴とするL-グルタミンの製造法に関する。

生育にビオチンを要求するL-グルタミン酸生産菌によるL-グルタミンの生産はL-グルタミン酸の生産条件に類似して培地中のビオチン濃度を菌の生育に対して制限することがまず必須であり、さらに培地中の窒素源を炭素源に対して菌の増殖生活に必要な以上加え、かつ特定量以上の重金属イオンを添加することによりL-グルタミンの生産量を増大せしめる方法が知られている(特公昭39-7391, 同42-7595, 同43-6993等)。さら

株によりL-グルタミンの生産性が高められる(特公昭51-44196)ことも知られているが、この場合も同様に培地中のビオチン濃度を制限量にすることが絶対的条件であるため、炭素源として廃糖蜜のようにビオチン含量の多い原料は安価でも使用できず、やむをえず高価な精製糖等が使われてきた。

本発明者らは過剰量のビオチンを含む安価な粗原料を用い、L-グルタミンを製造する方法につき研究した結果、従来のL-グルタミン酸またはL-グルタミン生産菌を親株として変異誘導したリゾチームに感受性を有する変異株を用いれば、過剰のビオチン含有培地を用いても、ビオチンによる抑制を受けることなく高い収率でL-グルタミンを生産できることを見出した。

以下本発明をさらに詳細に説明する。

本発明によればコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属に属し、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する過剰のビオチンによつてL-グルタミンの生産が抑制されない性質を有する微生物を培地に培養すれば培地中にL-グルタミンが蓄積するので、これを採取することにより高収率にL-グルタミンが得られる。

本発明に用いる微生物はコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属に属し、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する過剰のビオチ

ンによつてL-グルタミンの生産が抑制されない性質を有する微生物であればいかなる菌株をも用いることができる。一般にはコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属し、L-グルタミン、またはL-グルタミン酸生産能を有する菌株を親株とし、これを変異誘導処理して得られた変異株からリゾチームに感受性を有するものを選択し、これを用いる。変異誘導の方法としては、紫外線照射、放射線照射、変異誘起剤処理等の通常の方法が用いられる。変異誘導された変異株からリゾチームに感受性を有する菌株を選択するには、親株が生育可能な濃度のリゾチームを含有する培地で生育できなくて、リゾチーム無添加培地では親株と同様に生育できるものを選べばよい。従つて、ここでリゾチームに感受性であるとは、リゾチームに対する最小阻止濃度が親株よりも低いことを意味する。また培地中に存在する過剰のビオチンによつてL-グルタミンの生産が抑制されないとは、培地中に存在する過剰のビオチンによるL-グルタミン生産の抑制が実質的に無視できる程度のものであることを意味する。具体的には前記のごとき粗原料を用いた場合でも過剰のビオチンによる影響をうけることなくL-グルタミンの生産ができることを意味する。

本発明に用いる具体的に好適な菌株の一例としては、コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC13032を親株として得られたコリネバクテリウム・グルタミクム KY9703 (微工研菌寄第4412号、NRRL11271)、およびブレビバクテリウム・フラブム ATCC14067を親株として得られたブレビバクテリウム・フラブム KY9733 (微工研菌寄第4414号、NRRL11273) があげられる。

コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC13032を親株としてリゾチーム感受性変異株を取得する方法について以下具体的に説明する。該親株を粉末ブイヨン (極東製薬社製) 20 g/l および酵母エキス 5 g/l の組成を有する培地 (殺菌前 pH 7.2、以下 C 培地という) に植菌し 30°C で振盪培養する。中期対数期で培養を中止し、集菌し、生理食塩水で洗浄後、M/20 トリス・マレート緩衝液 (pH 6.0) に  $5 \times 10^8$  細胞/ml になるように懸濁する。この懸濁液に最終濃度 500  $\mu$ g/ml になるようにニトロソグアニジンを加え、25°C で 30 分間放置し、遠心分離により菌体

を集め、同一緩衝液で菌体を洗浄後、生理食塩水に懸濁し、適宜生理食塩水で希釈して C 培地にさらに 2 g/dl の寒天を含む固体培地 (以下 CA 培地という) に塗布つける。これを 30°C で 2 日間培養し、生じたコロニー (約 6000) を次の 3 種類の固体培地にレプリカ法により塗布つける。

① CA 培地

② CLA 培地: CA 培地を加熱殺菌後、冷却して培地の温度が 45°C まで下がってから 200 mg/l になるようにリゾチームを添加した培地。

③ MA 培地: グルコース 10 g/l、 $\text{NH}_4\text{C}$  4 g/l、尿素 2 g/l、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/l、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  3 g/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10 mg/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  400 mg/l、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  15 mg/l、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  9 mg/l、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  4 mg/l、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  0.09 mg/l、 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.04 mg/l、ビオチン 30  $\mu$ g/l、サイアミン塩酸塩 1 mg/l、システイン塩酸塩 20 mg/l および寒天 20 g/l の組成を有する培地 (殺菌前 pH 7.0)。

30°C で 2 日間培養後、CA 培地で生育し、CLA 培地で生育しない菌をリゾチーム感受性変異株として得る。MA 培地で親株と同様に生育する自己栄養性でリゾチームに対して感受性の変異株は試験した 6000 コロニーの中に 110 株得られた。この 110 株中 3 株がビオチン過剰培地でも多量の L-グルタミンを生産する能力を有していた。コリネバクテリウム・グルタミクム KY9703 はかくして得られた変異株の一例である。

ブレビバクテリウム・フラブム ATCC14067 を親株とする変異誘導も上記と同様に行つて、ブレビバクテリウム・フラブム KY9733 を得た。

上記例示の変異株の MA 培地、CA 培地、CLA 培地での生育およびリゾチーム感受性について親株と比較した結果を第 1 表に示す。3 種類の固体培地上での生育はレプリカ法で塗布つけ、30°C で 2 日間培養後判定した。表中生育欄の + は菌の生育が観察されたものを、- は生育が観察されなかつたものを示す。また表中リゾチーム感受性は次のように試験した。すなわち C 培地にて 24 時間 30°C 液体振盪培養した菌を集菌後、生理食塩水にて適当に希釈して菌体の懸濁液をつくる。

この懸濁液 10<sup>8</sup> 細胞相当を倍々系列の濃度のリゾチームを含有する CA 培地に滴下接種し、30°C

で2日間培養する。菌の生育がまったく認められない最小のリゾチーム濃度を菌のリゾチーム感受性値（最小生育阻止濃度）とした。

第 1 表

菌 株	生 育			リゾチーム感受性値最小生育阻止濃度 (MIC $\mu\text{g/ml}$ )
	MA 培地	CA 培地	CLA 培地	
コリネバクテリウム・グルタミクム				
KY 9703	+	+	-	100
ATCC 13032	+	+	+	800
ブレバクテリウム・フラブム				
KY 9733	+	+	-	50
ATCC 14067	+	+	+	800

本発明の微生物を培養するための培地は、炭素源、窒素源、無機化合物、その他の栄養素を適当に含む培地ならば、通常L-グルタミン生産に用いられる天然培地、合成培地のいずれも使用できる。たとえば炭素源としては蔗糖、ブドウ糖、糖蜜などの糖質および澱粉糖化液などが、窒素源としてはアンモニア、硫酸アンモニウム、塩酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、燐酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、水酸化アンモニウム、クエン酸アンモニウム、酒石酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、尿素などの有機無機窒素化合物、ペプトン、肉エキス、コーンスチープリカーなどの天然栄養源などが、無機化合物としては燐酸第一カリ、燐酸第二カリ、硫酸カリ、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸第一鉄、塩化第二鉄、硫酸マンガン、塩化マンガン、酢酸鉛、クロム酸カリ、塩化ニッケル、塩化コバルト、硫酸亜鉛、モリブデン酸アンモニウムなどが、その他の栄養源としてはビオチン、サイアミンなどが用いられる。

培養は振盪培養、通気攪拌培養などの好気的条件下で行い、培養温度は24~37℃とくに28~33℃が好適である。培養中は適当な中和剤を用いてpHを6~9に調整するのが好ましい。培養は1~3日間行えば培養液中に著量のL-グルタミンが生成蓄積する。培養液からのL-グルタミンの採取は、菌体を除去した上清液から、イオン交換樹脂

による吸脱着法、濃縮晶析法、等電点晶析法など、従来のL-グルタミンの製造において常用される諸方法を適宜使用して行うことができる。

以下に本発明の実施例を示す。

## 5 実施例 1

グルコース75g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  20g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/l,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2mg/l,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2mg/l, サイアミン塩酸塩 1mg/l, ビオチン3.5 $\mu\text{g/l}$ あるいは100 $\mu\text{g/l}$ および $\text{CaCO}_3$  20g/lの組成を有する培地を調製し、pHを7.2に調整した後、30mlずつ300ml容のフラスコに入れ、115℃で15分間加熱殺菌した。この培地に第2表に示した菌の種培養を接種し、30℃にて40時間振盪培養した。かくして培養液中に蓄積したL-グルタミン量は第2表に示す通りであった。

第 2 表

菌 株	L-グルタミン蓄積量 mg/ml	
	ビオチン 3.5 $\mu\text{g/l}$ 添加培地	ビオチン 100 $\mu\text{g/l}$ 添加培地
コリネバクテリウム・グルタミクム		
KY9703	12.2	19.0
ATCC13032	1.5	<0.1
ブレバクテリウム・フラブム		
KY9733	11.3	15.0
ATCC14067	1.1	<0.1

## 実施例 2

甘蔗廃糖蜜200g/l (グルコースとして100g/l相当量),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  20g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/l,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2mg/l,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2mg/l, サイアミン塩酸塩 1mg/lの組成を有する培地3lを5lジャーファーマンターに仕込み、常法により殺菌した後、アンモニア水でpHを0.7に調整してから、第3表に示した菌の種培養300mlを接種し、30℃、通気量5l/min, 600rpmにて培養を行った。培養期間中はアンモニア水でpHを6.5に維持しながら36

7

8

時間培養した。培養液中に蓄積したL-グルタミン量は第3表に示す通りであつた。

KY9703株の発酵終了液1ℓより遠心分離によつて菌体を除去して得た上清液から、イオン交換樹脂を用いる常法にしたがつてL-グルタミンの5精製を行つたところ、L-グルタミンの粗結晶11.6gを得た。

第 3 表

菌 株	L-グルタミン蓄積量 (mg/ml)	10
コリネバクテリウム・グルタミクム KY9703 ATCC13032	26.2 <0.1	15

菌 株	L-グルタミン蓄積量 (mg/ml)
ブレヴィバクテリウム・フラブム KY9733 ATCC14067	23.6 <0.1